

## KINETIKA HIDROLISIS PATI SINGKONG MANIS (*MANIHOT ESCULENTA*) PADA SUHU RENDAH

Hargono

Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof.Sudharto, Tembalang, Semarang, 50275, Telp./Fax. (024) 7460058/(024) 76480675  
Email : hargono@che.undip.ac.id

### Abstrak

*Singkong manis (Manihot esculenta) merupakan tanaman perdu yang dapat tumbuh di daerah tropis, seperti di Indonesia. Kandungan karbohidrat singkong manis mencapai 90,46% sehingga layak dikonversi menjadi gula reduksi dan etanol. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan hidrolisis enzimatis pati singkong manis pada suhu 30°C sebagai alternatif pengganti hidrolisis konvensional yang membutuhkan suhu tinggi (90-125°C). Jenis enzim yang digunakan adalah granular starch hydrolyzing enzyme (GSHE) yaitu Stargen™ 002 yang merupakan enzim koktail yaitu campuran dari A. kawachi  $\alpha$ -amilase dari Trichoderma reesei dan glucoamilase dari A. niger. Hidrolisis enzimatis dilakukan pada substrat pati singkong manis pada konsentrasi 100, 200, 300 dan 400 g/L, konsentrasi enzim 1.5% (w/w pati), selama 24 jam, pH 4, dan suhu 30°C. Selama hidrolisis 24 jam, kondisi terbaik dicapai pada waktu 12 jam yang menghasilkan gula reduksi masing-masing adalah 40,12; 58,32; 60,24 dan 61,34 g/L. Gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis pati singkong manis pada konsentrasi diatas 200 g/L hanya sedikit lebih besar dibandingkan gula reduksi yang dihasilkan dari hidrolisis pati singkong manis pada konsentrasi 200 g/L. Hal ini menunjukkan terjadi inhibisi substrat yang menghambat proses difusi. Parameter kinetika yaitu  $V_{maks}$  dan  $K_m$  ditentukan dengan persamaan Michaelis-Menten dan Lineweaver-Burk. Nilai  $V_{maks}$  dan  $K_m$  yang diperoleh dari hidrolisis ini adalah 9,074 g/L.jam, dan  $K_m$  104,26 g/L. Nilai  $K_m$  yang kecil menunjukkan bahwa untuk mencapai proses katalitik optimal dibutuhkan konsentrasi substrat yang kecil, sehingga akan menghemat biaya proses hidrolisis.*

**Kata kunci:** GSHE, gula reduksi, parameter kinetika, pati singkong manis, suhu rendah

### 1. PENDAHULUAN

Singkong (*Manihot esculenta*) atau ubi kayu merupakan tanaman pangan perdu. Sejumlah laporan telah mendukung pandangan bahwa singkong berasal dari Amerika Selatan (Clemen *et al.*, 2010; Balagopalan *et al.*, 1988). Allem (1994) mengemukakan pengakuan tiga sub spesies dari *Manihot esculenta* yaitu: *Manihot esculenta esculenta*, *Manihot esculenta peruviana* dan *Manihot esculenta flabellifolia*. *Manihot esculenta Crantz* termasuk dalam famili *Euphorbiaceae* dan merupakan tanaman singkong unggulan yang dibudidayakan. Famili dari tanaman ini umumnya dibagi menjadi dua kelompok utama, yaitu varietas pahit atau beracun dan varietas yang manis atau tidak beracun (Elias *et al.*, 2004; Nye, 1991). Kadar karbohidrat pada singkong manis sebesar 90,46% (Hapsari *et al.*, 2013), oleh karena itu melalui proses hidrolisis enzimatis singkong manis layak dikonversi menjadi glukosa dan etanol.

Hidrolisis enzimatis pati terdiri dari 2 tahap, yakni : proses likuifikasi (90-125°C) dan sakarifikasi (55-65°C). Kedua proses ini merupakan proses hidrolisis konvensional. Pada

proses hidrolisis pati, digunakan enzim jenis alfa-amilase dan gluko-amilase. Enzim alfa-amilase yang berfungsi untuk memutus ikatan amilosa pati pada proses likuifikasi, sementara glukoamilase akan berperan pada tahap sakarifikasi untuk menguraikan pati dan menghasilkan monomer glukosa.

Dalam proses fermentasi dibutuhkan energi yang besar untuk proses pemanasan dan pendinginan. Sebesar 30 - 40% dari total energi proses produksi etanol digunakan untuk kedua proses ini (Lee *et al.*, 2012). Hidrolisis enzim tunggal terhadap bahan baku pati (amilum) akan menghasilkan gula reduksi yang konsentrasinya semakin besar dengan kenaikan kandungan amilum dalam bahan baku (Suresh *et al.*, 1999).

Gohel dan Duan melakukan hidrolisis terhadap *Indian broken rice* dan *Pearl Millet* dengan variasi konsentrasi substrat 30 dan 35%, diperoleh hasil gula terfermentasi untuk *Indian broken rice* lebih tinggi bila dibandingkan dengan *Pearl Millet*. Pengembangan proses hidrolisis konvensional telah dilakukan oleh banyak peneliti dengan cara menurunkan suhu hidrolisis menjadi lebih rendah (50-65°C)

menggunakan enzim campuran  $\alpha$ -amilase dan glukamilase.

Hidrolisis enzimatis pada suhu rendah memberikan peluang beberapa enzim bekerja secara sinergi dalam granula pati, sehingga tidak diperlukan lagi likuifikasi dan langkah pemasakan (*cooking*). Proses hidrolisis ini dapat mereduksi kebutuhan energi (Galvez, 2005). Shariffa *et al.* (2009) melaporkan hasil penelitian pati tapioka menggunakan campuran enzim alfa-amilase dan glukamilase dengan temperatur 50°C selama 24 jam, diperoleh *Dextrose equivalent* maksimum 36%. Uthumporn *et al.* (2012) melakukan hidrolisis pati jagung menggunakan campuran alfa-amilase dan glukamilase pada temperatur 30-50°C selama 24 jam, diperoleh kenaikan *Dextrose equivalent* dari 53% menjadi 56%.

Tujuan penelitian ini mencari data kinetika hidrolisis dan parameter kinetika dari berbagai konsentrasi pati singkong manis menggunakan *granular starch hydrolyzing enzyme (GSHE)* pada suhu 30°C

## 2. METODOLOGI

### Singkong manis

Singkong manis (*Manihot esculenta*) diperoleh dari Godean, Daerah Istimewa Yogyakarta, saat dipanen berumur 10 bulan.

### Ekstraksi ubi singkong

Ubi singkong dipilih, dicuci serta dikupas kulitnya. Lalu daging ubi diparut, dicampur dengan air dan diremas-remas agar pati yang terkandung dalam perasan ubi tersebut keluar. Langkah selanjutnya adalah pemisahan pati dari campurannya dengan menyaring menggunakan kain sambilan diperas menggunakan tangan sampai pati yang diinginkan semuanya terpisah dari saringan. Air dan pati yang lolos dari saringan dibiarkan selama 24 jam agar pati mengendap. Selanjutnya pati dan air dipisahkan (dilimbang), dijemur untuk mengurangi kandungan airnya dengan cara dipanaskan dengan sinar matahari selama 3 hari berturut turut. Pati ubi singkong yang sudah kering (kandungan air sekitar 10%) disimpan dalam tempat penyimpanan yang bersuhu 4°C pada Laboratorium Bioproses, Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik Undip.

### Reagen kimia

Potassium sodium tartrate tetrahydrate dan 3,5-Dinitrosalicylic acid (by Merck), NaOH (98%, Merck), Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (98.5%, Merck), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (98.5%, Merck), sodium acetat buffer (Merck) and glucose (99.5%, Merck) dibeli dari Sigma-Aldrich Indonesia.

### Enzyme

Jenis enzim yang digunakan adalah *granular starch hydrolyzing enzyme (GSHE)*, yaitu *Stargen<sup>TM</sup> 002*, merupakan campuran dari *Aspergillus kawachi* alfa-amilase dari *Trichoderma reesei* dan gluco-amilase dari *Aspergillus niger* yang dihasilkan oleh Genencor (Palo Alto, USA). Aktivitas enzim 570 GAU/g dan pH optimal 4-4,5. (Genencor, 2009)

### Hidrolisis enzimatis

Pati casava dibuat slury dengan konsentrasi 100, 200, 300 dan 400 g/L, pada pH 4 dengan cara mengatur menggunakan 50 mM sodium acetate buffer, konsentrasi enzim 1.5% (w/w). Campuran umpan hidrolisis diinkubasi pada 80°C selama 15menit, diaduk dengan pengaduk kontinyu pada kecepatan 100 putaran per menit. Selanjutnya slury didinginkan sampai suhu 30 °C dan diinkubasi selama 48 jam. Secara berkala dengan interval 6 jam, sampel diambil untuk dianalisa kandungan produk gula reduksi menggunakan Spektrophotometer (UV-160A, SHIMADZU, Kyoto, Japan). Sebelum dilakukan analisis sampel terlebih dahulu dilakukan pemusingan (centrifugasi), pada 100 rpm, selama 10 menit untuk mendapatkan filtrat yang akan dianalisis gula reduksinya.

### Konsentrasi Substrat Mempengaruhi Kecepatan Reaksi yang Dikatalisis oleh Enzim

Kecepatan reaksi Pada konsentrasi substrat yang cukup rendah, kecepatan reaksi juga akan sangat kecil, kecepatan ini akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Kecepatan awal reaksi akan meningkat dengan nilai peningkatan yang semakin kecil (Copeland, 2009). Hubungan antara  $V_0$  dan  $[S]$  dinyatakan secara matematika persamaan Michaelis Menten sebagaimana ditunjukkan pada oleh persamaan 1:

$$V_0 = \frac{V_{maks} [S]}{[S] + K_m} \quad (1)$$

dengan :

$V_0$  = kecepatan awal pada konsentrasi substrat [S]

$V_{maks}$  = kecepatan maksimum, yaitu kecepatan yang berangsur-angsur dicapai pada konsentrasi substrat tinggi

[S] = konsentrasi awal substrat

$K_m$  = tetapan Michaelis-Menten enzim bagi substrat tertentu atau konsentrasi substrat yang menghasilkan setengah kecepatan maksimum

### Penentuan Parameter Kinetika

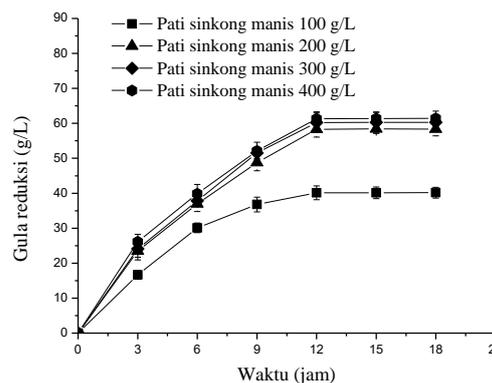
Salah satu pendekatan sederhana dalam percobaan kinetika adalah untuk mengukur kecepatan reaksi mula-mula ( $V_0$ ). Kecepatan reaksi mula-mula untuk setiap konsentrasi substrat ditentukan dari slop kurva pada awal reaksi. Karakteristik konstanta  $V_{max}$  dan  $K_m$  dapat ditentukan melalui persamaan 2 (Lineweaver-Burk, 1934). Persamaan ini merupakan hubungan antara  $1/[S]$  vs  $1/V_0$ . Kurve yang didapat adalah garis lurus dengan slope =  $K_m/V_{maks}$ , sedangkan intersep =  $1/V_{maks}$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{maks}} \left[ \frac{1}{[S]} \right] + \frac{1}{V_{maks}} \quad (2)$$

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Pengaruh Konsentrasi Pati Singkong Manis (*Manihot esculenta*) terhadap Konsentrasi Gula Reduksi

Pengaruh konsentrasi pati singkong manis 100, 200, 300 dan 400 g/L dan pengaruh Stargen™ 002 pada konsentrasi 1,5% terhadap konsentrasi gula reduksi, ditunjukkan pada Gambar 1. Kenaikan konsentrasi pati singkong manis dari 100 g/L ke 200 g/L, terjadi kenaikan konsentrasi gula reduksi 45,36% (dari 40,12 g/L menjadi 58,32 g/L). Kenaikan konsentrasi pati dari 200 g/L ke 300 g/L, terjadi kenaikan konsentrasi gula reduksi 3,29% (dari 58,32 g/L menjadi 60,24 g/L), sedangkan pada kenaikan konsentrasi pati dari 300 g/L ke 400 g/L, terjadi kenaikan konsentrasi gula reduksi 1,86% (dari 60,24 g/L menjadi 61,36 g/L).



**Gambar 1. Pengaruh konsentrasi pati singkong manis, terhadap konsentrasi gula reduksi menggunakan Stargen™ 002, konsentrasi 1,5% (b/b), pH 4, suhu 30°C.**

Berdasarkan Gambar 1 menunjukkan profil kenaikan konsentrasi gula reduksi yang signifikan. Kenaikan konsentrasi gula reduksi yang tinggi dicapai pada konsentrasi pati 200 g/L. Kenaikan gula reduksi yang rendah dicapai pada konsentrasi pati diatas 200 g/L. Rendahnya peningkatan konsentrasi gula reduksi pada konsentrasi pati singkong manis diatas 200 gr/L disebabkan oleh inhibisi dari substrat. German *et al.* (2011) menyatakan bahwa aktivitas enzim akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi substrat, tetapi aktivitas enzim akan menurun pada konsentrasi substrat tertentu karena adanya inhibisi dari substrat. Inhibisi substrat terjadi pada konsentrasi substrat yang tinggi.

Viskositas substrat akan semakin besar seiring dengan besarnya konsentrasi substrat, hal ini akan memperlambat proses difusi sehingga reaksi enzimatik akan dikontrol oleh proses difusi (*diffusion limitation*) (Baks *et al.*, 2008). Pada proses hidrolisis pati, enzim mulai terhambat oleh substrat pada konsentrasi substrat 250 g/L (Yankov *et al.*, 1986). Dari hasil percobaan terlihat bahwa pada konsentrasi pati singkong manis diatas 200 g/L, konsentrasi pati singkong manis tidak berpengaruh terhadap gula reduksi. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi pati singkong diatas 200 g/L sudah terjadi inhibisi substrat terhadap enzim. Hal yang berbeda terlihat pada konsentrasi pati singkong manis 100 g/L dan 200 g/L.

Konsentrasi gula reduksi yang dihasilkan pada konsentrasi substrat 100 g/L lebih rendah dibandingkan pada konsentrasi substrat 200 g/L. Perbedaan ini terjadi karena pada konsentrasi dibawah 200 g/L belum terjadi inhibisi substrat sehingga peningkatan

konsentrasi substrat akan menaikkan konsentrasi gula reduksi. Ruiz *et al.* (2011) telah melakukan kajian tentang proses hidrolisis pati singkong menggunakan Stargen<sup>TM</sup> 001 dan menyimpulkan bahwa aktivitas enzim akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi pati, akan tetapi aktivitas enzim akan menurun pada konsentrasi pati diatas 250 g/L.

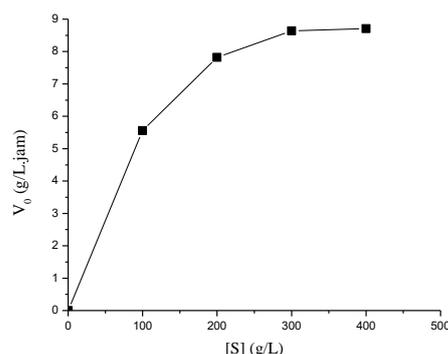
### Pengaruh konsentrasi awal substrat terhadap kecepatan awal

Sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2, hubungan kecepatan awal enzim dengan konsentrasi pati singkong manis sering kali diasumsikan sebagai bentuk kinetika saturasi. Aktivitas awal enzim meningkat dengan meningkatnya konsentrasi awal pati singkong awal. Kecepatan awal enzim meningkat dari 5,56 menjadi 8,64 g/L.jam (untuk konsentrasi pati singkong 300 g/L), selanjutnya pada konsentrasi pati singkong 400 g/L, mencapai hampir konstan, yaitu 8,71 g/L.jam. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi pati yang besar berakibat viskositas slury menjadi besar sehingga akan menghambat proses difusi (Baks *et al.*, 2008).

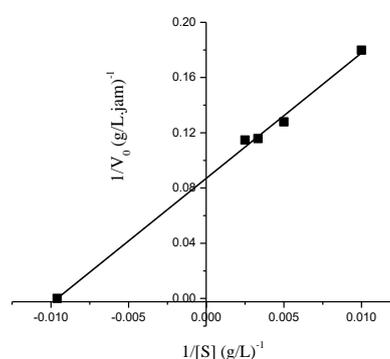
### Penentuan Parameter Kinetika $K_m$ dan $V_{maks}$

Parameter kinetika, yaitu  $K_m$  dan  $V_{maks}$  ditentukan dengan persamaan 2. Selanjutnya hubungan antara  $1/V_0$  dan  $1/[S]$  ditunjukkan pada Gambar 3. Menurut persamaan 2, nilai  $K_m/V_{maks}$  merupakan slope, sedangkan  $1/V_{maks}$  adalah intersep dari kurve garis lurus seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3. Hasil pembacaan dari kurve diperoleh nilai  $V_{maks}$  9,074 g/L.jam, sedangkan  $K_m$  104,26 g/L. Nilai  $K_m$  menunjukkan bahwa untuk mencapai proses katalitik optimal dibutuhkan konsentrasi substrat yang optimal pula (Michaelis-Menten, 1913) dan Lehninger, 1982). Nilai  $V_{maks}$  menunjukkan kecepatan reaksi mencapai maksimum meskipun konsentrasi substrat bertambah.

Pada kondisi tersebut enzim telah mencapai kondisi jenuh oleh substratnya sehingga tidak dapat berfungsi dengan baik Lehninger, 1982). Hasil ini similar dengan penelitian yang dilakukan Hargono *et al.* (2017) tentang hidrolisis pati singkong pahit dan pati gadung, diperoleh nilai  $K_m$  dan  $V_{maks}$  adalah 141,64; 140,84 g/L dan 13,33; 7,46 g/L.jam.



**Gambar 2.** Pengaruh konsentrasi awal pati singkong terhadap kecepatan aktivitas awal enzim pada konsentrasi enzim 1,5%, pH 4 dan 30°C.



**Gambar 3.** Plot Lineweaver-Burk untuk berbagai konsentrasi pati singkong manis terhadap kecepatan aktivitas awal enzim

## KESIMPULAN

Hidrolisis enzimatis pati singkong manis (*Manihot esculenta*) pada konsentrasi 200 g/L menggunakan Stargen<sup>TM</sup> 002 pada konsentrasi 1,5%, pH 4 dan 30°C selama 12 jam merupakan kondisi terbaik. Gula reduksi yang dihasilkan pada kondisi ini adalah 58,32 g/L. Pada konsentrasi pati diatas 200 g/L (300-400 g/L) terjadi inhibisi substrat yang akan menghambat proses difusi. Pada konsentrasi pati singkong manis 100-400 g/L diperoleh nilai  $V_{maks}$  9,074 g/L.jam, sedangkan  $K_m$  104,26 g/L.

## DAFTAR PUSTAKA

- Allem, A.C., (1994), The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 41 (3), pp. 133-150.
- Baks, T., Bruins, M. E., Janssen, A. E. M., Boom, R. M., (2008). Effect of Pressure

- and Temperature on the Gelatinization of Starch at Various Starch Concentrations. *Biomacromolecules*, 9(1), pp. 296-304.
- Balagopalan, C., Padmaja, G., Nanda, S.K., Moorthy, S.N., (1988). Cassava in Food, Feed, and Industry. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Clement, C.R., de Cristo, A.M., Coppens D. E.G., Alves, P.A., Picanço.R.D., (2010), Origin and domestication of native Amazonian crops. *Diversity*, 2 (1), pp. 72-106.
- Copeland, Robert A., (2000). *ENZYMES A Practical Introduction to Structure Mechanism, and Data Analysis. Second Edition*. New York: A John Wiley & Sons, Inc.
- Elias, M., Mühlen, G.S., McKey, D., Roa, A.C., Tohme, J., (2004), Genetic diversity of traditional South American landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): an analysis using microsatellites. *Econ Bot*, 58 (2): pp. 242-256.
- Galvez, A., (2005), Analyzing cold enzyme starch hydrolysis technology in new ethanol plant design, *Ethanol Producer*. 11, pp. 58-60.
- Genencor. STARGENT™ 002. (2009). Granular starch hydrolyzing enzyme for ethanol production.
- German, D.P., Weintraub, M.N., Grandy, A.S., Lauber,C.,L.,Rinkes, Z.L., Allison, S.D., (2011). Optimization of hydrolytic and oxidative enzyme methods for ecosystem studies. *Soil Biology & Biochemistry*, 43, pp. 1387-1397.
- Gohel, V., Duan, G., Maisuria, V. (2013). Impact of an acid fungal protease in high gravity fermentation for ethanol production using indian sorghum as a feedstock, *Biotechnology Progress*, 29, pp.329-336.
- Hapsari, M. A. dan Pramashinta, A. (2013). Pembuatan Bioetanol dari Singkong Karet (*Manihot glaziovii*) sebagai Upaya Mempercepat Konversi Minyak Tanah ke Bahan Bakar Nabati. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industr*. 2(2), pp. 240-245.
- Hargono, H., Jos, B., Kumoro, A. C. (2017). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of sweet cassava starch and bitter cassava flour and gadung (*Dioscorea hispida* Dennst) flour at low temperature. *Bulletin Chemical Reaction Engineering & Catalytic*, 12 (2), pp.256-262.
- Lee, W.S., Chen, I.C., Chang, C.H., Yang, S.S. (2012). Bioethanol production from sweetpotato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*. *Renewable Energy*, 39, pp. 216-222.
- Lehninger AL. Principles of Biochemistry. 5<sup>th</sup>. New York: W.H. Freeman. 1982.
- Lineweaver H, Burk D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, pp. 658-666.
- Michaelis, L., and Menten, M. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung, *Biochem.Z.*, 49, pp. 333-369.
- Nye, M.M. (1991). The Mis-measure of manioc (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) *Economic Botany Journal*, 45 (1), pp. 47-57.
- Shariffa, Y. N., Karim, Fazilah, and Zaidul, I. S. M. (2009). Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization suhu. *Food Hydrocolloid*, 23(2), pp.434-440.
- Suresh, K., Kiransree, N., and Venkateswar Rao, L. (1999). Production of ethanol by raw starch hydrolysis and fermentation of damaged grains of wheat and sorghum. *Bioprocess Engineering*, 21(2), pp. 165-172.
- Uthumporn, U., Shariffa, Y.N., Karim, A.A. (2012). Hydrolysis of native and heat-treated starches at sub-gelatinization suhu using granular starch hydrolyzing enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(5), pp. 1167-1182
- Yankov, D., Dobрева, E., Beschkov, Emanuilova. (1986). Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable  $\alpha$ -amylase. *Enzyme and Microbiol Technology*, 8, pp. 665-667.